

菌の遺伝子バンク上で検索した。その結果、4種類の遺伝子 (pgsA, pgsA1, pgsA2, pssA) が、この共通構造を持つ蛋白質をコードしていた(Fig.1)。

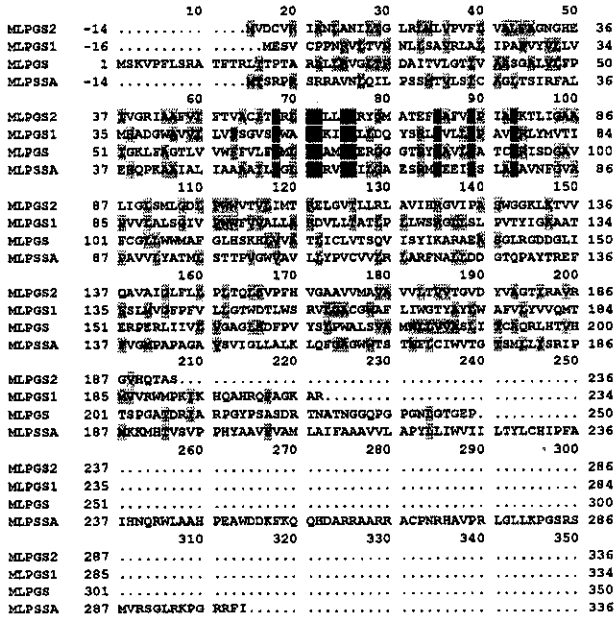


Fig.1 Alignment of the amino acid sequences

しかし、どの遺伝子が PIS をコードしているのかわからないため、4種類の遺伝子をそれぞれ発現させて、実際に PIS 酵素活性を測定し確認した。

構築した各プラスミドを導入した形質転換株を破砕し調製した各画分の PIS 酵素活性を測定した(Table 1)。その結果、酵素活性のほとんどは P60 画分に存在した。比活性も各転換株間で2倍程度の変動があった。一方、膜画分では pgsA1 遺伝子を発現させた株で、インサートのないベクターのみで形質転換したコントロール株に比べて9倍程度比活性が高いことがわかった。

Table 1. Phosphatidylinositol synthase activity in *M. smegmatis* transformants

Plasmid	P60 membrane		cytosol
	cpm min ⁻¹ mg ⁻¹		
pMV-pgsA	523	5.5	9.6
pMV-pgsA1	262	30.5	20.7
pMV-pgsA2	529	14.1	15.7
pMV-pssA	278	4.5	9.6
vector only	181	3.3	8.2

また、サイトソールでは、各転換体の酵素活性はコントロールとほとんど変わらなかった。これらの結果は、らい菌の PIS は pgsA1 遺伝子がコードしており、リコンビナント体は膜画分に分泌されることを示唆している。

一連の実験での PIS 活性の測定は、反応によって生成した PI の放射活性を測定している。しかし、放射性の PI を生成する反応には、注目している PIS を介した合成経路 (CDP-DG dependent reaction) と既に存在している PI のイノシトールと放射性のイノシトールとの交換反応 (CDP-DG independent reaction) の2つの経路があることが知られている(Fig.2)。

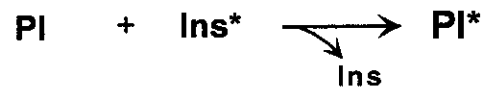
CDP-DG dependent reaction

(Phosphatidylinositol synthase)



CDP-DG independent reaction

(Phosphatidylinositol/inositol exchange enzyme)



*: Radio-labelled compound

Fig.2 Two ways for the formation of radio-labelled phosphatidylinositol in the assay system

これらの反応を区別するために、pgsA1 を発現させた *M. smegmatis* の P60 画分と膜画分を使い、CDP-DG を除いた条件下で、生成した PI の量を比較した (Table 2)。

P60 画分では測定系に CDP-DG を加えなくとも、加えた場合とほぼ同じ量の放射性 PI が生成していた。この結果は、P60 画分では PIS を介した PI の生成反応ではなく、イノシトールの交換反応によって生成した放射性 PI を検出していることを示している。

一方、膜画分では CDP-DG(-)の条件で生成した PI のカウントは 164cpm/mg であったが、標準の測定系では 1273cpm/mg だった。CDP-DG の有無でカウントに差が生じたということは、pgsA1 の膜画分では、交換反応で生成した放射性の PI

Table 2. Effect of CDP-DG on phosphatidylinositol synthase activity in P60 and membrane fraction

Fraction	Plasmid	CDP-DG(+)		CDP-DG(-)	
		cpm mg ⁻¹			
P60	pMV-pgsA1	15231	14865		
	vector only	11253	11737		
Membrane	pMV-pgsA1	1273	164		
	vector only	101	104		

を測定しているのではなく、PIS によって CDP-DG とイノシトールから生成した PI を測定していることを示している。この結果からも pgsA1 遺伝子が PIS をコードしており、発現させた PIS は膜画分に分泌されるということを強く示唆している。

D. 考察

Salman らによるとホストとして用いた *M. smegmatis* の PIS 酵素活性は、P60 画分にあることが報告されている³⁾。しかし、らい菌のリコンビナント PIS は *M. smegmatis* の native な PIS とは異なり膜画分中に分泌されることを示唆する結果を得た。yeast の PIS や phosphatidylserine synthase (PSS) は、膜画分に存在していること、また PIS 遺伝子を発現させるとリコンビナント体は膜画分に移行することが知られている。一方、*E. coli* の PSS はリボゾーム結合型で、膜画分ではなく、破碎後の遠心で 10,000 x g の沈殿画分 (P60 画分) に分画されることが報告されている。

このように同じリン脂質合成酵素であっても菌の種類、あるいは酵素の種類によって存在する部位が異なる可能性が十分考えられる。PIS に関しては、ほ乳類や他の菌においてもすべてが膜蛋白質として報告され、*M. smegmatis* 場合のように cell wall 画分に PIS が存在するというのは初めてのケースである。*M. smegmatis* だけが例外なのか、あるいは他の速発育性の抗酸菌も同様に PIS が cell wall の画分に存在するのか明らかにする必要があると考えられる。

E. 結論

らい菌の PIS 候補の遺伝子は、4 つ存在し、それぞれ発現させて酵素活性を測定したところ

pgsA1 と名付けた遺伝子が PIS をコードしていることがわかった。また、リコンビナント PIS は、膜画分に分泌されることが明らかになった。

[文献]

- Hunter S.W. and Brennan P.J. (1990): Evidence for the presence of a phosphatidylinositol anchor on the lipoarabinomannan and lipomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem.* 265(16): 9272-9279.
- Nikawa J., Kodaki T. and Yamashita S. (1987): Primary structure and disruption of the phosphatidylinositol synthase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 262(10): 4876-4881.
- Salman M., Lonsdale J.T., Besra G.S. and Brennan P.J. (1999): Phosphatidylinositol synthesis in mycobacteria. *Biochim Biophys Acta.* 1436(3): 437-450.

F. 研究発表

1. 論文発表

- Kazue Nakanaga, Shinji Maeda, Yuka Myojin, De Long XU and Yoshiaki Goto: Sequence analysis and expression of *Nramp-1* gene in *Bcg^f* and *Bcg^s* mice. *J. Vet. Med. Sci.* 61, 717-720. (1999)
- Masanori Kai, Masanori Matsuoka, Noboru Nakata, Shinji Maeda, Masaichi Gidoh, Yumi Maeda, Ken Hashimoto, Kazuo Kobayashi and Yoshiko Kashiwabara: Diaminodiphenylsulfone resistance of *Mycobacterium leprae* due to mutations in the dihydropteroate synthase gene. *FEMS Microbiol. lett.* 177, 231-235. (1999)
- Mohamed A. Jamal, Shinji Maeda, Noboru Nakata, Masanori Kai, Kunihiko Fukuchi and Yoshiko Kashiwabara: Molecular basis of clarithromycin resistance in *Mycobacterium avium-intracellulare* complex. *Tuber. Lung Dis.* 80, 1-4. (2000)

2. 学会発表

- 柏原嘉子、松岡正典、甲斐雅規、前田伸司、中田登、前田百美、長尾栄治、金城邦浩、後藤正道、北島信一、並里まさ子、尾崎元昭、柳橋次雄、L.E.Takaoka: キノロン耐性が疑われた

症例から得られたらい菌の *gyrA* 遺伝子の変異、
第 72 回日本ハンセン病学会、1999 年 4 月（東京）

- (2) 松岡正典、前田伸司、甲斐雅規、中田登、
小林和夫、柏原嘉子、和泉眞蔵、Cue-Tae Chae、
Thomas P. Gillis : らい菌 *rpoT* 遺伝子の多型性
とその地理的分布、第 72 回日本ハンセン病学
会、1999 年 4 月（東京）
- (3) Mohamed A. Jamal, Shinji Maeda, Noboru
Nakata, Masaichi Gidoh, Yoshiko Kashiwabara :
Molecular Basis of Clarithromycin-Resistance in
Mycobacteria、第 72 回日本ハンセン病学会、
1999 年 4 月（東京）
- (4) S. Maeda, M. Matsuoka, M. Kai, N. Nakata, Y.
Maeda, Y. Kashiwabara: Mutations in the *gyrA*
gene of *Mycobacterium leprae* isolates resistant to
fluoroquinolones, 39th Inter Conference on
Antimicrobial Agents and Chemotherapy
(ICAAC), Sep. 1999, (San Francisco)
- (5) M. kai, N. Nakata, M. Gidoh, S. Maeda, Y.
Kashiwabara: Cloning a novel gene involved in
Dapsone resistance in mycobacteria, 39th Inter
Conference on Antimicrobial Agents and
Chemotherapy (ICAAC), Sep. 1999, (San
Francisco)
- (6) 松岡正典、前田伸司、甲斐雅規、中田登、
川津邦雄、柏原嘉子、Cue-Tae Chae、Yin ^G
Yue-Ping、Wu Qinxue、Abraham T. Agdamag :
らい菌 *rpoT* 遺伝子の多型性とその地理的分布
II . 韓国、中国におけるそれぞれの型の分布、
第 73 回日本ハンセン病学会、2000 年 3 月（鹿
児島）
- (7) 柏原嘉子、松岡正典、甲斐雅規、前田伸司、
中田登、前田百美、長尾栄治、後藤正道、北島
信一、並里まさ子、尾崎元昭、柳橋次雄、小原
安喜子、L.E.Takaoka、Mohammad Ali Abbasi、
Abraham T. Agdamag : 薬物耐性に関与するらい
菌の遺伝子変異、第 73 回日本ハンセン病学会、
2000 年 3 月（鹿児島）

分担研究報告書

らい菌の酸素代謝に関する研究

分担研究者 中田登 国立感染症研究所ハンセン病研究センター
病原微生物部第三研究室研究員

研究要旨

らい菌の酸素代謝に関わる分子については不明な点が多いが、これを明らかにすることにより新たな治療薬の開発が可能となる。本年度は結核治療薬として使用されるピラジナミド(PZA)の標的となる分子について検討した。PZAは結核菌に対して有効であるが、他のマイコバクテリアに対しては抗菌活性を持たない。そこでPZAと同様の作用機序を持つと考えられ、マイコバクテリアに広く抗菌活性を持つ5'クロロピラジナミド(5'Cl-PZA)を用いて *Mycobacterium smegmatis* の耐性変異株を分離し、その標的分子について検討した結果、脂肪酸合成酵素Iをコードする *fasI* 遺伝子が *M. smegmatis* の5'Cl-PZA耐性に関与していることが明らかとなった。

A.研究目的

らい菌は細胞内寄生菌であり、宿主動物のマクロファージ細胞の内部で増殖する。らい菌がマクロファージの産生する活性酸素などの攻撃から逃れて増殖するメカニズムについては不明な点が多いが、これを明らかにすることにより新たな治療薬の開発が可能となる。結核菌などのマイコバクテリアでは、菌の産生するカタラーゼが細胞内での生存に重要であることが示唆されているが、らい菌の *katG* は偽遺伝子であり、カタラーゼ遺伝子として機能していないことをこれまでに明らかにしてきた。*katG* 遺伝子の産物であるカタラーゼパーオキシダーゼは結核治療薬イソニアジド(INH)に作用してこれを活性化し、その結果結核菌の脂肪酸合成経路FAS IIシステムが阻害されるためにINHの抗菌作用が発現するが、らい菌は *katG* 遺伝子産物を持たないためINHに対して自然耐性であると考えられる。一方ピラジナミド(PZA)はINHと類似の化学構造を持ち、結核菌に対して特有の抗菌作用があるが、その標的分子は不明である。PZAは結核菌以外の菌に対しては効果がないため、マイコバクテリアに広い抗菌活性を示し、PZAと同様の作用機序を持つと考えられる5'クロロピラジナミド

(5'Cl-PZA)を用いて *Mycobacterium smegmatis* の耐性変異株を分離して解析することにより、PZAの標的分子について検討した。

B.研究方法

*M. smegmatis*はMC²155株を用いた。5'Cl-PZAの最小発育阻害濃度の測定は以下の方法で行った。Middlebrook 7H9培地1mlに5'Cl-PZAをそれぞれ300、150、75、37.5、18.75、0 μ g/mlの濃度で加え、約10⁵の菌を接種して37 $^{\circ}$ Cで振とう培養し、4日後に菌の増殖を判定した。*M. smegmatis*のDNAライブラリは大腸菌-マイコバクテリアシャトルコスミドベクターpYUB412を用いて作製した。*M. smegmatis*野生株 *fasI* 遺伝子断片は *fasI* 遺伝子のプロモータ領域、および3'末端領域のPCR増幅断片をプローブとして、ゲノムDNAライブラリに対してコロニーハイブリダイゼーションを行うことにより得た。コスミドへのトランスポゾン挿入はGenome Prime systemを用いてインビトロで行った。

C.研究結果

まず、*M. smegmatis*の5'Cl-PZA耐性変異株の分離を行った。5'Cl-PZA 50 μ g/mlを含むMiddlebrook 7H10プレート上に菌を塗布し、37 $^{\circ}$ Cで1週間培養することにより5'Cl-PZA耐性の変異株2株を分

離し、それぞれ N2613、N2614 と命名した。これら変異株に対する 5'Cl-PZA の最小発育阻害濃度は、それぞれ 150 μ g/ml、75 μ g/ml であった。そこでこれらの変異株から染色体 DNA を抽出し、制限酵素 *ScaI* で部分消化した後、シャトルコスミドベクター pYUB412 を用いて大腸菌を宿主としたゲノム DNA ライブラリを作製した。このライブラリ DNA を *M. smegmatis* 野生株に導入し、5'Cl-PZA 65 μ g/ml を含む 7H10 プレートと同薬剤を含まない 7H10 プレート上で得られるコロニー数を比較した。その結果、N2613、N2614 の両ライブラリ DNA から得られたトランスフォーマントの約 1/300 が 5'Cl-PZA 耐性を示した。

pYUB412 は *M. smegmatis* では染色体組込型ベクターとして働くので、5'Cl-PZA 耐性を付与した DNA 断片を回収するため、5'Cl-PZA を含むプレート上で得られたクローンについて N2613 ゲノム DNA 由来の 4 クローン、N2614 ゲノム DNA 由来の 2 クローンから染色体 DNA を抽出した。その後、制限酵素 *PacI* で消化してコスミド挿入 DNA 断片を切り出した後、再び pYUB412 に連結し、大腸菌に導入して回収した。得られたコスミドを PCR により調べたところ、全て脂肪酸合成酵素 I をコードする *fasI* 遺伝子を含んでいることがわかった。

そこで、N2613、および N2614 において *fasI* 遺伝子の変異が 5'Cl-PZA 耐性の原因であるかどうか調べるために、それぞれの変異株について相同組み換えによる野生株 *fasI* 遺伝子断片との交換実験を試みた。まず *M. smegmatis* 野生株の *fasI* 遺伝子断片のクローニングを行うために、*M. smegmatis* 野生株のゲノム DNA ライブラリを作製し、このライブラリからコロニーハイブリダイゼーションにより *fasI* 遺伝子断片を含むクローンの分離を行い最終的に 3 種類のクローンを得た。このうちの 2 種のクローンから得られたコスミドを用い、トランスポゾン挿入変異を行って、ランダムにトランスポゾンの挿入を持つコスミドクローンをそれぞれ 40 クローン得た。これらのコスミドのトランスポゾンの挿入部位を制限酵素消化、PCR、および DNA シークエンシ

ングにより調べ、*fasI* 遺伝子の上流約 2.0kb、下流約 1.0kb、および *fasI* 遺伝子内部にトランスポゾンの挿入を持つクローン 2 種の合計 4 クローンを分離した。これらのコスミドを制限酵素 *PacI* で消化してベクター部分を切り離し、*fasI* 遺伝子を含む 40-50kb の直鎖状 DNA 断片を得た。*fasI* 遺伝子断片の上流または下流にトランスポゾン挿入を持つ DNA 断片については、N2613、N2614 にエレクトロポレーションにより導入し、トランスポゾン内のカナマイシン耐性遺伝子をマーカーとしてトランスフォーマントを分離した。その結果、それぞれの変異株から、上流にトランスポゾン挿入を持つ DNA 断片に関しては約 10 クローン、下流にトランスポゾン挿入を持つ断片に関しては約 50 クローンのトランスフォーマントが得られた。これらのトランスフォーマントについて 5'Cl-PZA 耐性試験を行ったところ、N2613 に対して *fasI* 遺伝子下流にトランスポゾンを持つ断片を導入して得られた 1 株が 5'Cl-PZA 感受性であったため、染色体 DNA を分離しサザンハイブリダイゼーションにより遺伝子交換が行われたか調べたが、野生株の DNA 断片との交換は見られなかった。

また、結核菌は増殖が遅く、強い病原性を持つために大量培養して脂肪酸合成酵素 I を分離精製し性質を調べることは容易ではない。そこで結核菌の *fasI* 遺伝子を発現し、*M. smegmatis* の *fasI* 遺伝子を発現しない *M. smegmatis* 株の作製を試みた。結核菌の *fasI* 遺伝子断片を染色体上とマルチコピーベクター上持つ *M. smegmatis* をそれぞれ作製し、先の方法で分離した *fasI* 遺伝子内部にトランスポゾン挿入を持つ 2 種の直鎖状 DNA 断片をエレクトロポレーションによりそれぞれ導入して、カナマイシン耐性トランスフォーマントを分離し、相同組み換えによる遺伝子不活化実験を行った。得られたトランスフォーマントそれぞれ 20 クローンから染色体 DNA を分離し PCR により調べたが *fasI* 遺伝子の不活化は見られなかった。

D. 考察

5'Cl-PZA 耐性株の DNA ライブラリから得られたトランスフォーマントの約 1/300 が 5'Cl-PZA 耐性であった。*M. smegmatis* のゲノムサイズは約 6000kb であり、使用したコスミドの挿入断片の平均サイズは約 45kb であることから、ほぼ挿入断片に偏りのないライブラリが作製されたものと考えられるが、調べた 5'Cl-PZA 耐性クローン全てに *fas1* 遺伝子が見られたことから、5'Cl-PZA 耐性と *fas1* 遺伝子が関与が強く示唆された。*fas1* 遺伝子は約 9kb のサイズを持つが、野生株と耐性株の *fas1* 遺伝子の DNA シークエンシングを行うことにより変異の有無を明らかにできると考えられる。

エレクトロポレーションによる直鎖状 DNA 断片の導入によって遺伝子の交換・不活化が見られなかったが、これは用いた DNA 断片が約 40~50kb と大きく、ライブラリ作製時に偶然コスミド内に染色体上の他領域の DNA が組み込まれたため、それに対応する染色体上の領域との相同組み換えが起こった結果かもしれない。*fas1* 遺伝子上流と下流の DNA 断片を短くすることにより相同組み換えによる DNA 断片の交換の効率が上がると考えられる。

E. 結論

M. smegmatis 野生株、および 5'Cl-PZA 耐性株 2 株から *fas1* 遺伝子を含む全長約 45kb の領域をクローニングした。染色体組込型ベクターを用いてこれら 5'Cl-PZA 耐性株の *fas1* 断片を *M. smegmatis* 野生株に導入すると、5'Cl-PZA 耐性となることなどから、*fas1* 遺伝子が 5'Cl-PZA 耐性に関与していることがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kai, M., Matsuoka, M., Nakata, N., Maeda, S., Gidoh, M., Maeda, Y., Hashimoto, K., Kobayashi, K., and Kashiwabara, Y.
Diaminodiphenylsulfone resistance of *Mycobacterium leprae* due to mutations in the dihydropteroate synthase gene.
FEMS Microbiology Letters, 177, 231-235, 1999

- (2) Matsuoka, M. Izumi, S. Budiawan, T., Nakata, N.: *Mycobacterium leprae* DNA in daily using water as a possible source of leprosy infection. Indian J. Lepr. 71: 61-67, 2000

- (3) Jamal, M. A., Maeda, S., Nakata, N., Kai, M., Fukuchi, K. and Kashiwabara, Y.
Molecular basis of clarithromycin resistance in *Mycobacterium avium-intracellulare* complex.
Tubercle and Lung Disease 80: 1-4, 2000

2. 学会発表

(1) 中田登

らい菌のカタラーゼ遺伝子に関する研究
第 72 回日本ハンセン病学会総会、東京、平成 11 年 4 月

- (2) 柏原嘉子、松岡正典、甲斐雅規、前田伸司、中田登、前田百美、長尾榮治、金城邦浩、後藤正道、北島信一、並里まさ子、尾崎元昭、柳橋次雄、L.E.Takaoka: キノロン耐性が疑われた症例から得られたらい菌の *gyrA* 遺伝子の変異
第 72 回日本ハンセン病学会総会、東京、平成 11 年 4 月

- (3) 松岡正典、前田伸司、甲斐雅規、中田登、小林和夫、柏原嘉子、和泉眞蔵、Gue-Tae Chae, Tomas P. Gillis: らい菌 *rpoT* 遺伝子の多型性とその地理的分布
第 72 回日本ハンセン病学会総会、東京、平成 11 年 4 月

- (4) Mohamed A. Jamal, Shinji Maeda, Noboru Nakata, Masaichi Gidoh, Yoshiko Kashiwabara: Molecular basis of clarithromycin-resistance in mycobacteria.
第 72 回日本ハンセン病学会総会、東京、平成 11 年 4 月

- (5) Maeda, S., Matsuoka, M., Kai, M., Nakata, N., Maeda, Y. and Kashiwabara, Y.
Mutations in the *gyrA* gene of *Mycobacterium leprae* isolates resistant to fluoroquinolones.

Mycobacterium leprae isolates resistant to fluoroquinolones.

39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999

(6) Kai, M., Nakata, N., Gidoh, M., Maeda, S. and Kashiwabara, Y.

Cloning a novel gene involved in Dapsone resistance in mycobacteria.

39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999

(7) 柏原嘉子、松岡正典、甲斐雅規、前田伸司、中田登、前田百美、長尾栄治、後藤正道、北島信一、並里まさ子、尾崎元昭、柳橋次雄、小原安喜子、L. E. Takaoka

薬剤耐性に関与するらい菌の遺伝子変異

第73回日本ハンセン病学会総会、平成12年3月

(8) 松岡正典、前田伸司、甲斐雅規、中田登、川津邦雄、柏原嘉子、Gue-Tae Chae, Yin Yue-Ping, Abraham T. Agdamag
らい菌 *rpoT* 遺伝子の多型性とその地理的分布 II. 韓国、中国におけるそれぞれの型の分布

第73回日本ハンセン病学会総会、平成12年3月

分担研究報告書

抗酸菌におけるP450型酵素の研究

分担研究者 青山 由利 創価大学工学部 助教授

研究要旨

抗酸菌である結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* に見いだされたステロール14-脱メチル化P450(CYP51)と類似の遺伝子がコードする結核菌CYP51の性質と機能の解析のために、結核菌CYP51を大腸菌で発現させた。大腸菌の可溶性画分に発現した結核菌 CYP 51を、硫酸分画後、3種類のカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。精製酵素はSDS-PAGE的にほぼ均一であり、見かけの分子量は5万であった。精製結核菌CYP51のスペクトルの特徴は哺乳動物やパン酵母のCYP51の特徴と同一であったが、還元型CO結合物は哺乳動物やパン酵母のものに比べ非常に不安定であった。

A. 研究目的

抗酸菌の中で全ゲノム解析が明らかになった結核菌には、P450スーパーフェミリー酵素と推定される遺伝子が21個見いだされている。このP450型酵素群の中で、ステロールを生合成していないと推定される結核菌に、真核生物に必要なステロール14-脱メチル化P450 (CYP51) 類似の遺伝子が存在しており、この結核菌CYP51がどのような役割を担っているのかは興味深い。またP450型酵素群は多彩な触媒機能を有しているが、基本的には一原子酸素添加反応を行う酵素であり、結核菌中に21種のP450分子種が存在する意味を考えるひとつの材料として、真核生物に幅広く存在しP450の進化を考える上で重要な分子種であるCYP51に焦点をあてて解析を行った。解析には、大腸菌に発現させた結核菌CYP51を精製した標品を用いて、結核菌CYP51の性質およびその機能について検討した。

B. 研究方法

昨年度、結核菌ゲノムDNAからCYP51をクローニングして構築した大腸菌での発現ベクター(pCW mycoCYP51)を用いて、大腸菌JM109株を形質転換した。この菌体を培養し、IPTG添加により結核菌CYP51を発現させた。発現した結核菌CYP51を大腸菌の可溶性画分に回収し、硫酸分画の後、DE52、Gio-GelHTおよびSephadex G-50のカラムクロマトグラフィーにより精製した。

C. 研究結果

pCWmycoCYP51で形質転換した大腸菌 JM109株を0.9 Lの培養液で培養し、IPTG添加後、一晚培した菌体の可溶性上清には、比含量0.46nmol/mg prot.の結核菌CYP51が241nmol存在した。研究方法で述べた精製法により、16.8 nmol/mg prot.の精製結核菌CYP51を、38.6%の回収率で93.1nmol得ることが出来た。精製標品はSDS-PAGE的にほぼ均一であり、結核菌CYP51の見かけの分子量は5万であった。

精製した結核菌CYP51の酸化型のスペクトルは、418.5 nmにSoret帯を、570、535 nmに α および β 帯の吸収を有し、還元型および還元型CO結合物のSoret帯は、それぞれ412、447.5 nmであった。これらのスペクトルの特徴はラットやパン酵母のCYP51の特徴と一致するものであった。しかしながら、結核菌CYP51の還元型CO結合物は不安定でありP420と称されるP450の分解物に非常に早く変化した。この還元型CO結合物での不安定さは、非常に安定なパン酵母のCYP51とは対照的であった。しかし結核菌CYP51も、酸化型では4℃の条件下1週間放置しても安定であった。

機能を解析するため、ラノステロールおよびジヒドロラノステロールを基質として、未精製の結核菌CYP51を用いて反応を行った。CYP51の反応にはNADPHからの電子を伝達する電子伝達体が必要であるので、今回はラットのNADPH-P450還元酵素、ウシのアドレノドキシシンとその還元酵素およびホウレンソウのフェレドキシシンとその還元酵素を用い、各々37℃で1時間反応を行ったが14-脱メチル化された代謝物は得られなかった。

D. 考察

結核菌CYP51は、真核生物のCYP51がミクロゾームの膜結合型であるのとは異なり膜結合部分のN末側アミノ酸領域が存在しない推定されたが、他の可溶性である細菌のP450分子種と同様可溶性酵素として大腸菌内に発現した。そして、SDS-PAGEでの見かけの分子量も膜結合部分が無いのに相当して小さいものであった。

結核菌CYP51のスペクトル的特徴はラットやパン酵母のCYP51の特徴と一致するものであった。しかしながら、結核菌CYP51の還元型CO結合物は不安定でありP420と称されるP450の分解物に非常に早く変化した。これは結核菌CYP51が還元型において、低イオン強度の緩衝液でさらにP450の安定剤であるグリセロールの濃度が低い場合に、異なるスペクトルに移行していくことと関連があると推定された。

P450が行う一原子添加反応には、NADPHまたはNADHからの電子を伝達する成分が必要であり、通常ミクロソーム型P450ではNADPH-P450還元酵素が電子伝達を行い、細菌やミトコンドリア型P450ではフェレドキシン様鉄イオウ蛋白質とその還元酵素が電子伝達を行っている。結核菌ゲノムにはNADPH-P450還元酵素類似の遺伝子は見いだされておらず、フェレドキシンおよびその還元酵素類似遺伝子はいくつか存在する。したがって、結核菌CYP51はフェレドキシン様鉄イオウ蛋白質とその還元酵素から電子を伝達されるものと推定され、今回の解析では結核菌中のこれらの電子伝達成分を用いた検討は行うことができなかったため、これらの点を明らかにしてさらに機能の解析を行う必要があると考えられた。

E. 結論

結核菌に存在するP450酵素群のうちその一分子種であるCYP51を、大腸菌に発現させ可溶性画分より結核菌CYP51を精製した。

結核菌CYP51のSDS-PAGEでの見かけの分子量は5万であった。そのスペクトル的特徴は、哺乳動物やパン酵母のCYP51の特徴と同一であったが、結核菌CYP51の還元型CO結合物は非常に不安定であった。今回検討した条件下では、結核菌CYP51はラノステロールおよびジドロラノステロールの14-脱メチル化反応を触媒することは出来なかった。

F. 研究発表

1. 総説および論文

- 1) Yoshida, Y., Aoyama, Y., Noshiro, M. and Gotoh O.
"Evolution and functional diversification of sterol-metabolizing P450: Evidence for the interaction between diversification of P450 and expansion of metabolic pathways"
Current Topics in Biochemical Research, Vol. 1, 103-112 (1999)
- 2) Nitahara, Y., Aoyama, Y., Horiuchi, T., Noshiro, M. and Yoshida, Y.
"Purification and characterization of rat sterol 14-demethylase P450 (CYP51) expressed in *Escherichia coli*"
J. Biochem., 126, 927-933 (1999)
- 3) Hori, K., Sakaguchi, A., Kudoh, M., Ishida, K., Aoyama, Y. and Yoshida, Y.
"Structure-activity relationship of a new antifungal imidazole, AFK-108, and related compounds"
Chem. Pharm. Bull., 48, 60-64 (2000)

2. 学会発表

- 1) Nitahara, Y., Aoyama, Y., Horiuchi, T., Yabusaki, Y., Kishimoto, K., Gotoh, O. and Yoshida, Y.
"Analysis of the structures necessary for the activity of sterol 14-demethylase by site-directed mutagenesis of rat CYP51"
11th International Conference on Cytochrome P450, September, 1999 Sendai (Japan)
- 2) Yoshida, Y., Aoyama, Y., Noshiro, M., Asai, K., Okonogi, K. and Gotoh, O.
"Modulation of substrate specificity during the evolution of CYP51 and associated P450s"
11th International Conference on Cytochrome P450, September, 1999 Sendai (Japan)
- 3) 青山由利、堀内忠郎、浅井健太郎、小此木研二、吉田雄三
「アゾール系抗真菌剤耐性酵母のステロール14-脱メチル化P450の大腸菌内発現による解析」第72回日本生化学会 1999年10月7日
- 4) 仁田原優子、青山由利、能城光秀、堀内忠郎、岸本加恵、薮崎義康、後藤修、吉田雄三
「大腸菌に発現させたラットCYP51のアミノ酸置換に伴う活性変化」
第72回日本生化学会 1999年10月7日

19990462

以降のページは雑誌／図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

- 1) Matsuoka M., Izumi S., Budiawan T. and Nakata N.: *Mycobacterium leprae* DNA in daily using water as a possible source of leprosy infection. Ind. J. Lepr. Vol.71 No.1 61-67 1999
 - 2) Izumi S., Budiawan T., Saeki K., Matsuoka M. and Kawatsu K.: An epidemiological study on *Mycobacterium leprae* infection and prevalence of leprosy in endemic villages by molecular biological technique. Ind. J. Lepr. Vol.71 No.1 37-43 1999
 - 3) Kai. M., Matsuoka M., Nakata N., Maeda S., Gidoh M., Maeda Y., Hashimoto K., Kobayashi K. and Kashiwabara Y.: Diaminodiphenylsulfone resistance of *Mycobacterium leprae* due to mutation in the dihydropyridone synthase gene. F E M S Microbiol. letters Vol. 177 231-235 1999
 - 4) Naito M., Matsuoka M., Ohara N., Nomaguchi H. and Yamada T. The antigen 85 complex vaccine against experimental *Mycobacterium leprae* infection in mice. Vaccine vol.18 795-798 2000
 - 5) Ohara N., Matsuoka M., Nomaguchi H., Naito M. and Yamada T.: Inhibition of multiplication of *Mycobacterium leprae* in mouse foot pads by recombinant bacillus Carumette-Guerin (BCG). Vaccine Vo.18 1294-1297 2000
- Jamal, M. A., Maeda, S., Nakata, N., Kai, M., Fukuchi, K., Kashiwabara, Y.: Molecular basis of clarithromycin-resistance in *Mycobacterium avium intracellulare* complex. Tuberc. Lung Dis. 80: 1-4, 2000.